

Ein orientierender Schnelltest
auf coliforme Keime
im Wasser

ILSE KABSCH

aus Breslau

1959

EIN ORIENTIERENDER SCHNELLTEST AUF COLIFORME

KEIME IM WASSER

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität Erlangen



zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Ilse Kabsch
aus Breslau

Als Dissertation genehmigt
von
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 1959

Dekan: Professor Dr. R. Fleischmann

Berichterstatter: Professor Dr. M. Knorr

Berichterstatter: Professor Dr. J. Schwemmle

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. Einleitung	1
B. Die Bedeutung von E. coli	4
C. Colinachweismethoden	8
I. Normale Laborverfahren	8
D. Orientierungsteste auf coliforme Keime	13
I. Colitest nach LEVIN u. Mitarb.	13
II. Bactostrip und Galle-Violettrot= streifen nach FÖRG	14
III. TTC-Agglutinationstest nach KRAUS ...	15
IV. Der Nitratreduktionstest	17
E. Modifikation des Nitratreduktions= testes für Wasseruntersuchungen	20
I. Qualitative und quantitative Bestimmung von Nitrit in biologischem Material	20
II. Methodik	25
III. Die Nährlösung des Orientierungs= testes	27
a. Das Grundmedium	27
b. Wachstumsstimulierende Zusätze ...	29
c. Verbesserung der Haltbarkeit und der Selektivität	33
d. Die Herstellung der gebrauchts= fertigen Nährlösung	34
e. Die Durchführung des Testes	35

	Seite
IV. Der Colitest unter den Verhältnissen der Praxis	37
V. Ergebnisse der Untersuchungen	40
Z u s a m m e n f a s s u n g	45
L i t e r a t u r n a c h w e i s	49

A. Einleitung

Die bakteriologische Beurteilung von Trink- und Nutzwasser stützt sich in der Hauptsache auf die Gesamtkeimzahl im aeroben Kulturverfahren und auf die Art und Menge coliformer Bakterien; erhöhte Beachtung schenkt man ferner dem Streptococcennachweis (z.B.: GUTHOF und DAMMAN²⁹, BUKHARDT und LEGLER¹²). Bei einer exakt durchgeführten Analyse unterscheidet man in „coliforme Keime“, die z. B. Aufschluß über den Erfolg einer Wasserbehandlung geben können und in sog. „typische Fäkalcoli“ als Maßstab der Gefährdung des Wassers durch Darminfektionserreger. Darüber hinaus schließt ein negativer Colibefund bis zu einem gewissen Grade auch eine Virusinfektion aus (GILCREASE und KELLY²⁷).

Eine Colidifferenzierung ist also bei der bakteriologischen Wasseruntersuchung unumgänglich. Aus den Röhrchen mit Gasbildung bzw. von den verdächtigen Kolonien stellt man zunächst Reinkulturen her, die mit Hilfe von Gärungsreaktionen etc. endgültig typisiert werden. Das Ergebnis kann jedoch erst zu einem Zeitpunkt mitgeteilt werden, an dem das untersuchte Wasser bereits verbraucht wurde. Der erforderliche Zeitaufwand dieses Prüfungsverfahrens bietet zwar die gewünschte Sicherheit der Diagnostik, er gewährleistet aber nicht den direkten Schutz der Gesundheit der Bevölkerung.

Ferner ist zu berücksichtigen, daß die Durchführung der bakteriologischen Untersuchungen nur von Fachkräften in ausreichend ausgestatteten Labors möglich ist. Man kann deshalb die innerbetriebliche bakteriologische Wasseruntersuchung ausschließlich für Großanlagen befürworten. Bei den mittleren und kleineren zentralen Wasserversorgungsanlagen sind die dafür vorgesehenen bakteriologischen Untersuchungsstellen heranzuziehen. Das Einsenden der Proben, die schriftliche Mitteilung usw. verzögern dabei nochmals den Eingang des Befundes.

Es steht außer Zweifel, daß wir heute noch nicht in der Lage sind, die Sicherheit der bakteriologischen Diagnose mit der wünschenswerten Schnelligkeit zu kombinieren. Im Ernstfalle kann es aber auf jede Stunde Zeitgewinn ankommen, damit man längerdauernde oder mehrfach auftretende Verunreinigungsschübe, wie sie z.B. für Hannover 1926 und Gelsenkirchen charakteristisch waren (KNORR₃₇), rechtzeitig erkennen kann.

Zur Beseitigung dieses Mangels in der Untersuchungsmethodik erachten wir eine Ergänzung der normalen bakteriologischen Wasseruntersuchung durch einen Orientierungstest auf coliforme Keime zum direkten Schutz der Gesundheit für erforderlich.

Dieser Test soll und kann die bisherige Methodik

keinesfalls ersetzen. Er muß vor allem geeignet sein, in möglichst kurzer Zeit den Hinweis zu geben, daß coliforme Keime mit großer Wahrscheinlichkeit eingedrungen sind, daß also Sicherheitsmaßnahmen wie Chlorung etc. durchgeführt werden müssen. Der Test kann jedoch seinen Zweck nur erfüllen, wenn er technisch so einfach gestaltet ist, daß er in der Hand von geschulten Laien zuverlässig arbeitet. Nur so kann er - bei gleichzeitig geringen Kosten der einzelnen Reaktionen - innerbetrieblich an jeder, auch einer kleinen Wasserversorgungsanlage durchgeführt werden.

B. Die Bedeutung von E. coli

Den Colinachweis in Lebensmitteln führt man in der Mehrzahl der Fälle zur Verhütung der Übertragung von Darminfektionserregern durch. Bereits 1888 wurde von MACE⁴⁵, 1892 von DUNBAR¹⁷ und SMITH⁶⁴ darauf hingewiesen, daß der Nachweis von Bacterium coli gute Anhaltspunkte für Infektionen mit Fäkalien gibt. 1893 betont KIESSLING³⁵, daß der Befund von Bact. coli als sicheres Zeichen einer Fäkalverunreinigung zu werten ist. Auch SCHARDINGER⁶⁰ schlug 1894 zur Umgehung des direkten Nachweises der Typhusbakterien vor, das Augenmerk auf gewisse „Gärungserreger“ zu lenken, die mit denen im menschlichen Darm vorkommenden identisch seien. In den Jahren 1895 - 1897 erschienen zahlreiche Arbeiten, (z.B.: BURRI¹³, MARPMANN⁴⁶, ABBA¹, POUJOL⁵³ u.a.), die sich weiter mit diesem Gedanken befaßten. 1895 wurde von FREUDENREICH²¹ erstmalig eine Titermethode für den quantitativen Colinachweis angegeben.

Die Bedeutung von E. coli als Fäkalindikator wurde aber im Laufe der folgenden Jahre wieder angezweifelt (KRUSE⁴⁰). Während in England und Amerika bereits 1905 Bact. coli als Fäkalindikator gesetzlich anerkannt wurde, blieb man in Deutschland, Frankreich, Italien und Österreich

noch sehr lange skeptisch - GÄRTNER²². Bedeutende Beiträge zur Coliforschung wurden von BUTTIAUX¹⁴, BRISOU und MAGROU¹⁰, LEVINE⁴³, MINKEWITSCH⁴⁷, PARR⁵⁰ und MAASSEN und PRIESS⁴⁸ u.a. geleistet. Nach QUANTZ⁵³ wurde schließlich das dem Warmblüterdarm entstammende Bact. coli seit 1914 überall als Indikator fäkaler Verunreinigungen anerkannt. Dieser Vorschlag gilt bis heute, jedoch nur bezüglich der sog. Fäkaltypen, die sich durch bestimmte Gärungsleistungen bzw. Wachstumsbedingungen auszeichnen.

Während über die Bewertung dieser Fäkaltypen demnach weitgehend Einigkeit besteht, trifft dies für die coliformen Keime noch nicht zu. Zum Teil schließt man sie aus, andere beurteilen sie in gleichem Sinne wie die Fäkaltypen. Ein solches starres Schema scheint uns aber nicht brauchbar. Es kann einerseits nicht bestritten werden, daß sich coliforme Keime in Ausscheidungen befinden, andererseits verbietet ihr häufiges Vorkommen in der Natur den direkten Schluß: Coliforme positiv = Fäkalverunreinigung nachgewiesen. Wir hatten 1957 die bestehende Ansicht dahingehend zusammengefaßt, daß von den Colikeimen nur E. coli Typ I und irregularis Typ I als Fäkalindikatoren wichtig sind.

Merkmale: 44 ⁰ Indol Methylrot Voges-Prosk. Citrat					
Coli I	+	+	+	-	-
Irregul. I	-	+	+	-	-

Bewertet man nichtfäkale Typen mit, dann geschieht dies aus reiner Vorsicht, doch beweist ihr alleiniges Vorkommen keinesfalls eindeutig das Vorliegen einer Fäkalverunreinigung. Die Bedeutung solcher Bakterien variiert vielmehr mit dem Fundort; Aerobacter u.a. gramnegative Stäbchen sind z.B. in gechlortem Wasser bedenklich, während sie an anderer Stelle nicht unbedingt zu einer minderen Qualifikation führen - z.B. SCHÄFER₅₉.

HABS und LANGELOH₃₀ kamen bei dem Versuch, die Bedeutung der coliformen Keime zu klären, praktisch zu dem gleichen Ergebnis, nämlich: „daß diese zwar nicht als Indikator einer fäkalen Verunreinigung angesprochen werden können, aber doch nicht bedeutungslos sind. Ein Befund von atypischen Colibakterien in einer Wasserprobe wird als Anlaß zu einer Beanstandung angesehen mit der Begründung, daß der Nachweis dieser Bakterien dafür spricht, daß ungenügend filtrierte Oberflächenwasser Zutritt zu dem Wasservorkommen hat.“ Sie beurteilen die coliformen Keime also ähnlich wie die Gesamtkeimzahl.

Wir sind durchaus der Meinung, daß der Befund: „100 ml Wasser: frei von Coliformen und Fäkaltypen“ ein erstrebenswertes Ziel darstellt. Für zentrale Versorgungsanlagen wird man dieses Ziel auch als Forderung anerkennen. Wollte man das Prinzip aber auf alle Versorgungen übertragen, dann müßte man die überwiegende Zahl der Einzel-

versorgungen sperren. Ein Schematismus ist also wirklichkeitsfremd, ebenso wie er es bei der Bewertung eines bakteriologischen Befundes ausschließlich aus der Sicht des Laboratoriums und an Hand starrer „Grenzzahlen“ ist. Die Colizahl stellt keinen Maßstab für den Grad der Fäkalverunreinigung dar (BORNEFF₆) und ein negativer bakteriologischer Befund schließt eine Gefährdung nicht aus! Wir sind deshalb der Zustimmung aller Wissenschaftler sicher, wenn wir feststellen, daß eine sichere Beurteilung nur bei Ergänzung des bakteriologischen und chemischen Befundes durch die Ortsbesichtigung möglich ist. Dies gilt vor allem für die grundlegende Beurteilung neu erstellter Anlagen. Darüber hinaus dient die bakteriologische Untersuchung aber noch als Routinetest auf das einwandfreie Funktionieren in Betrieb befindlicher Anlagen. Da der Colitest in diesem Zusammenhange an erster Stelle zu nennen ist, sollen daher im folgenden kurz die Verfahren besprochen werden.

C. Colinachweismethoden

I. Normale Laborverfahren

Man verwendet teils die Anreicherungs- bzw. Titerverfahren, teils den direkten Nachweis auf festen Nährböden. Beide erfordern ein Mindestmaß an bakteriologischer Laborausrüstung und die Kenntnis der sterilen Arbeitsmethodik.

Die biochemische Definition des echten Fäkalcolibakteriums ist heute ziemlich fest umrissen, sie stellt die Grundlage der Untersuchungsmethodik dar. In BERGEYS Manual of determinative Bacteriology wird das Colibakterium fäkaler Herkunft mit folgenden biochemischen Reaktionen beschrieben:

- 1.) Säure- und Gasbildung aus Dextrose und Lactose innerhalb 48 Stunden, Nichtverflüssigung von Gelatine
(= allgemeine Kennzeichen der Escherichiae),
- 2.) Methylrotreaktion (MR) nach CLARK und LUBS positiv. Die Probe beruht darauf, daß Aerobacter aerogenes nur während der ersten 4-5 Tage in traubenzuckerhaltigen Nährböden Gas und Säure bildet, danach wird die Reaktion durch Abbau organischer Säuren und Bildung basischer Carbonate alkalisch. Zugewetztes Methylrot wird also gelb (alkalisch = negative MR). Bei E. coli bleibt der Nährboden infolge fortgesetzter Säurebildung aus Traubenzucker sauer (Rotfärbung bei Methylrotzusatz).

- 3.) Reaktion nach Voges - Proskauer (VP) negativ.
Mit dieser Reaktion wird das aus einem Dextrose enthaltenden Nährsubstrat gebildete Acetylmethylcarbinol nachgewiesen. Durch Zusatz von Kreatin oder Dicyandiamid, ammoniakalischer Kupfersulfatlösung und Natronlauge zu der bebrüteten Kultur erhält man nach Erhitzen bei Kreatin eine Rotfärbung, bei Dicyandiamid eine rotviolette Färbung.
(Die unter 2.) und 3.) ausgeführten Reaktionen sind allgemeine Kennzeichen des Genus I Escherichia).
- 4.) Kein Wachstum in Citratlösung nach KOSER (Ci),
keine Schwefelwasserstoffbildung
(= Kennzeichen von Escherichia coli).

Die anderen Formen des Genus I Escherichia (E. freundii und intermedium), sowie Genus II Aerobacter mit den beiden Formen aerogenes und cloacae zeigen ein derart ubiquitäres Vorkommen, daß sie als Fäkalindikatoren ausscheiden. JORDAN und BURROW₃₃ führen dies in einer Tabelle deutlich vor Augen.

Tabelle 1

Prozentuale Verteilung von coliformen Typen

Quelle:	Coli	Aerog.	Intermed.	Irreg.	Total
Milch	28,3	49,5	20,3	1,4	2224
Wasser	51,6	28,6	18,5	1,3	9496
Boden	23,8	54,3	18,8	3,1	1330
Getreide	17,9	73,8	7,3	1,0	587
Fäces	87,9	5,2	6,8	0,1	3974

Nach MINKEWITSCH⁴⁷ wird *Bacterium coli commune* fäkaler Herkunft zusätzlich durch Vergärung von Kohlehydraten, besonders Mannit bei 46° C (nach BULIR) typisiert. BRUNS¹¹ und GÄRTNER²² benutzen u. a. die schon vom Entdecker des Colibakteriums (ESCHERICH 1886) genannte Indolbildung. Den Vorschriften des „Ministry of HEALTH“ aus TOPLEY und WILSON⁷⁰ ist folgende Tabelle entnommen:

Tabelle 2

Bezeichnung:	44° C	Indol	MR	VP	Ci	Gel.	Vorkommen
Coli I	+	+	+	-	-	-	menschl.u. tier. Darm
Coli II	-	-	+	-	-	-	zweifelhaft
Irreg. I	-	+	+	-	-	-	menschl.u. tier. Darm
Irreg. II	+	-	+	-	-	-	zweifelhaft

(Die restlichen Coliformen sind hier weggelassen.)

In der Hauptsache hält man sich zur Differenzierung neben der „IMViC“ - Probe an das Vergärungsvermögen gewisser Kohlehydrate und an die H_2S - Bildung. Serologische Typisierungsmethoden wurden eingehend von KAUFFMANN³⁴ bearbeitet.

Will man sich bei der Primärkultur auf das Titerverfahren (z.B. Galle-Pepton-Lactose-Brilliantgrünlösung) beschränken, dann ist ein Schluß auf die Colizahl nur erlaubt, wenn jede Verdünnung mehrfach angesetzt wird (s. SIERP⁶⁶). In den amerikanischen STANDARTMETHODEN zur Untersuchung von Wasser und Abwasser ist die Fehlerbreite des Colititers durch einen Versuch belegt: bei Wasserproben, die sicher nur ein Colibacterium pro ml enthielten, wurde bei Aussaat von je 1 ml in Anreicherungsmedien zu 37% negative Resultate erzielt. Impft man dagegen auf feste Nährböden aus, dann kann man die Zahl relativ einfach bestimmen, doch entgehen geschädigte Keime z.T. dem Nachweis. Es ist dem Niederländischen Normenausschuß (Normblatt 3043) zuzustimmen, daß es keinen Sinn hat, auch geschwächte Bakterien der Coligruppe zur Entwicklung zu bringen. KNORR gibt deshalb der Direktaussaat im Schichtgußverfahren nach RAUCH⁵⁶ den Vorzug und verwendet auch heute noch Endoagar, weil hier eine Vorauslese der Keime an Hand von Koloniefarbe, -form und Fuchsinglanz möglich ist, wodurch die weitere Differenzierung erleichtert wird. Der Hauptmangel des Endoagars, die zu geringe Hemmung

der grampositiven Keime, besonders der Sporenbildner, konnte durch Hexachlorophenzusatz beseitigt werden (BORNEFF₅). Die kombinierte Aussaat auf Hexachlorophen- und Normalendoagar ermöglicht eine sichere Beurteilung.

Die in der letzten Zeit von verschiedener Seite (z.B.: WUNDT₇₂, SCHÖNBERG₆₂, GARGANI und MARRACCINI₂₃) empfohlene Verwendung von TTC-Nährböden zur Wasserdiagnostik wurde von SELENKA₆₃ einer genauen Prüfung unterzogen. Es zeigte sich, daß bei der Nährbodenherstellung eine besonders große Sorgfalt anzuwenden ist, sodaß zur Zeit noch das Endoverfahren als Routinemethode vorzuziehen ist. Normvorschriften bezüglich der Nährböden sind nicht zweckmäßig, da es verschiedene leistungsfähige Substrate gibt, und die Fortentwicklung nur gehemmt würde.

Gleichgültig, ob nun mit dem Titerverfahren oder der Direktaussaat gearbeitet wird, die Differenzierung der gasbildenden Keime bzw der fuchsinglänzenden Kolonien mit 5-6 Ansätzen in einer bunten Reihe (z.B. Lactose, Sacharose, Indol, Citrat, Bulir, H₂S) ist unbedingt zu fordern, Die alleinige Durchführung z.B. einer Dextrose- oder Lactosefermentation stellt eine Verletzung der Sorgfaltspflicht dar.

Bezüglich weiterer Einzelheiten sei auf die zusammenfassende Veröffentlichung von BRAUNE₈ sowie BORNEFF₅ verwiesen.

D. Orientierungsteste auf coliforme Keime

Bei dem Titerverfahren erhält man die ersten Hinweise auf das Vorhandensein von coliformen Keimen durch die Gasbildung aus Dextrose oder Lactose nach etwa 12-24 Stunden Bebrütung. Da jedoch diese Reaktionen üblicherweise nicht zur Nachtzeit abgelesen werden, kann man 24 Stunden als die "normale" Reaktionszeit ansprechen. Von einem Schnelltest kann deshalb bei diesem Verfahren nicht die Rede sein. Ernsthaft hat man sich erst in neuerer Zeit um die Entwicklung von Orientierungstesten bemüht, weshalb bis heute nur eine geringe Zahl zur Auswahl steht.

I. Colitest nach LEVIN, HARRISON und HESS⁴²

Dabei wird radioaktive Kohlensäure, die innerhalb 1-2 Stunden von den Colikeimen aus markierter Lactose gebildet wird, nachgewiesen. Die Kohlensäure wird durch Belüftung ausgetrieben, auf Bariumhydroxydpapier niedergeschlagen und mittels eines Geigerzählers mit Hilfe der Impulszahl quantitativ bestimmt. Zum Vergleich wird eine sterile Gegenprobe verwendet. Das Verfahren stellt einen wirklichen Schnelltest dar, der in kürzester Zeit ein vorläufiges Ergebnis vermittelt, doch erfordert die Durchführung solcher radioaktiven Messungen einen entsprechenden Aufwand an Geräten und an Personal, sodaß vorerst mit einer allgemeinen Einführung kaum zu rechnen ist.

II. Bactostrip und Galle-Violettrotstreifen nach FÖRG 20

Das Prinzip dieses Testes ist der Nachweis gramnegativer Keime in Kolonieform, es handelt sich also um ein direktes Zählverfahren. Als gramelektive Substanz, gleichzeitig aber auch als Indikator wird bei Bactostrip Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) verwendet. Die Arbeitsmethodik ist bei SCHILLING₆₁ referiert. Bei der Überprüfung des Bactostripverfahrens für Milch und Milchprodukte stellten BORNEFF und FROBEL₇ fest, daß im Mittel dabei nur 46% der Endocolizahl (*E. coli* Typ I) erfaßt wurde: im Einzelfall schwankten die Werte von 0 - 100%. Mit coliformen Keimen zeigte Bactostrip eine noch geringere mittlere Empfindlichkeit (1/10 - 1/100 der Endocolizahl)! Bei der Trink- und Abwasseruntersuchung fand BORNEFF₅ ein Coliformen-zahlverhältnis von Bactostrip : Galleviolettrot : Hexachlorophenendoagar = 1,0 : 2,3 : 6,0. Die Galleviolettrotstreifen wären also bei der Wasseruntersuchung dem Bactostrip vorzuziehen, doch ist auch hier die Empfindlichkeit immer noch geringer als beim Plattenverfahren. Dieser Mangel könnte u. U. noch in Kauf genommen werden, denn die Handhabung der Papierstreifenmethode -nach FÖRG „Papierbactographie“ genannt- ist technisch außerordentlich einfach. Gegen die Verwendung als betriebseigene, orientierende Wasseruntersuchung spricht jedoch die erforderliche Bebrütungszeit von 12 - 15

Stunden, die für normale Arbeitsverhältnisse recht ungünstig ist. Die Versammlung der Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker stellt sich 1956 auf den gleichen Standpunkt: das Verfahren biete keine zeitlichen Vorteile gegenüber dem bisherigen Filterverfahren (SCHILLING₆₁). Diese Feststellungen berühren nicht die Verwendbarkeit der Bactostripmethode für bestimmte, rein medizinische Belange, wie den Nachweis von Coli-keimen in Galle - z.B. GERNER und HENNING₂₆, GERNER₂₅, LEGLER und GERNER₄₁.

III. TTC - Agglutinationstest nach KRAUS₃₉

Unter Zugrundelegung der Arbeiten von SCHÖNBERG₆₂ führt KRAUS die einfache TTC-Bouillon als Coliformenschnelltest an, denn eine Formazanbildung (Rötung) trete bereits nach 3-6 Stunden auf. Genaue Angaben über die quantitativen Coliformennachweise werden jedoch von KRAUS nicht mitgeteilt. EBERT₁₈ hatte außerdem schon 1952 die TTC-Reduktion als Schnelltest wegen zu langer Reduktionszeiten abgelehnt. Danach ist sicher, daß nur sehr hohe Coliformenzahlen, wie sie im Wasser praktisch nicht auftreten, diese kurzfristigen Ergebnisse vermitteln. Vor allem spricht aber gegen diesen Test, daß TTC auf E. coli stärker hemmend wirkt als auf die Nichtfäkaltypen - KLEIN₃₆, BORNEFF und FROBEL₇. Das Prinzip der Agglutination sich vermehrender Colikeime in TTC - Bouillon, wobei im posi-

tiven Falle Flockenbildung und Aufhellung der Bouillon im Vergleich zu einem Kontrollröhrchen auftritt, ist zwar ein elegantes Verfahren, um rasch (4-10 Stunden) pathogene Coliarten aus Stuhlproben zu erkennen, für die orientierende Wasseruntersuchung scheidet die Methode aber außerdem wegen der Beschränkung auf 0,1 ml Untersuchungsflüssigkeit aus. Für Laien ist auch die Arbeitstechnik nicht einfach genug. Der TTC - Agglutinationstest ist folglich als Schnelltest für die Zwecke der Wasseruntersuchung nicht brauchbar, da:

- 1.) die praktisch vorkommenden Coliformenzahlen (ca. 1-100/ml) zu lange Reaktionszeiten erwar-
ten lassen,
- 2.) die Technik nicht einfach genug ist,
- 3.) nur Mengen bis 0,1 ml untersucht werden können,
- 4.) TTC auf E.coli stärker hemmend wirkt als auf
die Nichtfäkaltypen.

IV. Der Nitratreduktionstest

Das Prinzip dieses Testes wurde zu = erst von ARNOLD₂ und ZIEGLER₇₃ bei der Harnpro=
be auf Coli mit Hilfe des Griesschen Reagenz an= gewendet. Die Reduktion des Nitrates zu Nitrit führen jedoch neben den Colikeimen auch andere Mikroorganismen durch, z.B.: Salmonella typhi und paratyphi A und B, Salmonella enteritidis, Salmonella typhi murium, Shigella flexneri, Proteus, Aerobacter u.a. - PELZ₅₁. Nach unseren Erfahrungen besitzen noch Sarcinen, Staphylococcen und besonders aerobe Sporenbildner zum Teil ein kräftiges Reduktionsvermögen.

Es handelt sich also keinesfalls um
einen spezifischen Nachweis von E. coli! Die Be= teiligung der genannten Krankheitserreger der Ty= phusgruppe ist aber kein Nachteil, während das Nitratreduktionsvermögen von Heubazillen u.a. grampositiven Keimen stört.

Bei den Nitritproben von PFEILSTÜCKER₅₂, COSTAS und COSTAS₁₆ sowie von SAHLQUIST, WALLGREN und SJÖSTRÖM₅₈ wird auf die Hemmung der gramposi= tiven Keime verzichtet. Die Verfahren liefern das Ergebnis schnell und sind auch hochempfindlich; es besteht aber immer die Möglichkeit des Auftre= tens „unspezifisch“ positiver Reaktionen. Prak= tisch stellen sie einen allgemeinen Keimzahltest mit unvollkommener Erfassung der Arten dar.

KNORR und BORNEFF³⁸ glaubten von Anfang an, bei der Anwendung dieses Testes in der Lebensmittelhygiene nicht auf die Hemmung grampositiver nitrumbildender Keime verzichten zu können; sie konnten 1957 ein ausreichend zuverlässiges Verfahren für die Testung von Milch und Milchprodukten beschreiben.

Eine genaue Überprüfung der Methode - BORNEFF und FROBEL⁷ - ergab folgende Empfindlichkeit:

5	Std.	Bebrütung	Mittelwert	155 $\pm$ 144	E. coli/ml
6	"	"	"	40 $\pm$ 20	E. coli/ml
7	"	"	"	18 $\pm$ 35	E. coli/ml

Ferner konnte bei diesen Untersuchungen die Überlegenheit des Nitratreduktionstestes über den Bactostriptest nachgewiesen werden.

Die Bemühungen, die Nitratreduktion auch für die Schnelltestung von Coliformen in Wasser zugänglich zu machen, führten bisher jedoch nur zu einem vorläufigen Ergebnis (BORNEFF⁵).

Dieser 1957 beschriebene 5-8 Stunden Colitest für Wasserproben wies noch folgende Nachteile auf:

- 1.) Ansatz, Aufbewahrung und Verwendung des Reagenz mußten unter einwandfrei sterilen Bedingungen geschehen. Die Haltbarkeit war trotz steriler Arbeitsmethodik sehr begrenzt.

- 2.) Eine ausreichende Empfindlichkeit konnte nur unter Verzicht auf die Hemmung grampositiver Begleitbakterien erreicht werden, d.h. die Selektivität des Testes war mangelhaft.

Mit den im folgenden beschriebenen Versuchen wurden diese Fehler beseitigt, und wir können nunmehr das Verfahren zur Erprobung empfehlen.

E. Modifikation des Nitratreduktionstestes für Wasseruntersuchungen

I. Qualitative und quantitative Bestimmung von Nitrit in biologischem Material

Von der Vielzahl, der in der einschlägigen Literatur beschriebenen Nachweisverfahren für Nitrit, wurde für die nachfolgenden Versuche die Methode von BOLTZE und KATZMANN⁴ ausgewählt, die den Vorteil bietet, mit nur einem Reagenz, dem naphthionsaurem Natrium, ausgeführt werden zu können und die außerdem relativ einfach zu standardisieren ist.

Analoge chemische Nachweisverfahren beruhen auf der Diazotierung eines aromatischen Amins mit salpetriger Säure und folgender Kupplung des Diazoniumsalzes mit einer Azokomponente zu einem Azofarbstoff. Von den jeweiligen Nachweisreagenzien, Azo- und Diazokomponente, ist die Intensität und Qualität des gebildeten Farbstoffes abhängig. GRIESS²⁸ erkannte schon im Jahre 1878 die Bedeutung dieser Methode zur colorimetrischen Bestimmung geringster Nitritmengen sowohl in biologischem Material als auch im Trinkwasser. Er verwendete den Azofarbstoff Bismarckbraun, der in schwefelsaurer Lösung durch Einwirkung von salpetriger Säure auf m-Phenylen-diamin als brauner Farbstoff entsteht.

Bis zum heutigen Tage findet die Azore-

aktion, die einige Jahre später von ILOSVAY³¹ veröffentlicht wurde, Anwendung. Er diazotierte Sulfanilsäure in wässriger Lösung mit dem nachzuweisenden Nitrit und kuppelte das entstandene Diazoniumsalz mit α -Naphthylamin als Azokomponente. Es resultiert daraus der rote Farbstoff: α -Naphthylamin-4-azobenzolsulfosäure-(4), der sich sofort nach Zugabe der einzelnen Reagenzien bildet. Dieses Reagenz wird als „Reagenz nach GRIESS und ILOSVAY“ oder kurz „GRIESSsches Reagenz“ oder auch als „LUNGESches⁴⁴“ bezeichnet.

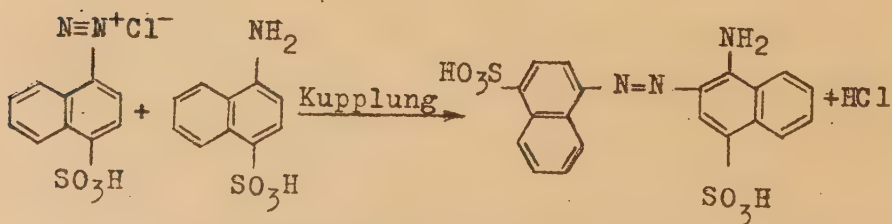
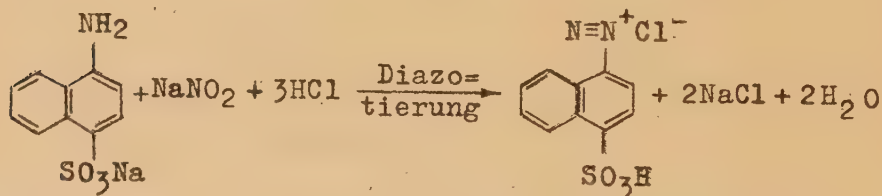
Als weiteres Nachweisverfahren wäre ferner die Methode nach ROMIJN⁵⁷ zu erwähnen, bei der eine empfindliche Farbreaktion zwischen α -Naphthylamin hydrochlorid, Weinsäure und Nitrit stattfindet. Nach GERMUTH²⁴ soll mit dem als Azokomponente reagierendem Dimethyl- α -naphthylamin eine besonders intensive und stabile Färbung erhalten werden.

Für BOLTZE und KATZMANN⁴ war das Verfahren zum Nachweis von Nitrit von JENDRASSIK und FALCSIK-SZABO³² und die Nitritbestimmung mit dem Pulfrich - Photometer zu Beginn der analytischen Arbeiten richtungsweisend. Die Sulfanilsäure des GRIESS - ILOSVAYschen Reagenz war hier durch das ebenso diazotierte Procain (Novocain, Jenacain) ersetzt. Als 1933 diese Methode veröffentlicht wurde, war bereits bekannt, daß Novocain durch salpetrige Säure diazotiert werden kann und

mit α -Naphthylamin gekuppelt einen roten Azofarbstoff bildet.

Bei Kupplung von α -Naphthylamin als Diazokomponente mit β -Naphthylamin-6,8-disulfosäure (Amino-G-Säure) erhält man nach STIEGLITZ und PALMER⁶⁷ eine ganz besonders empfindliche Azoreaktion. In essigsaurer Lösung entsteht eine blauviolette Farbe, die erst nach einiger Zeit ihr Maximum bei erhöhter Temperatur erreicht.

BOLTZE und KATZMANN⁴ verwendeten für ihre Untersuchungen naphthionsaures Natrium sowohl als Diazo-, als auch als Azokomponente, wodurch der Arbeitsgang erheblich vereinfacht wird. Die Reaktionen verlaufen folgendermaßen:



Aus den Formeln ist zu ersehen, daß das naphthionsaure Natrium nach Diazotierung mit sich selber kuppelt. Dieser Vorgang gewährleistet die einfache Handhabung des Reagens.

Die Extinktionen nehmen innerhalb einer Stunde ihren Höchstwert an. Der Farbstoff flockt nicht aus und bleibt ca. 3 Stunden stabil. Überschüssige Naphthionsäure wirkt nicht störend, da sie erst nach längerer Zeit auskristallisiert.

In einem Konzentrationsbereich von 1-40 Gamma pro ml entspricht die Eichkurve dem Lambert-Beerschen Gesetz, jedoch weicht der 40 Gamma-Wert um 3% von der Geraden ab.

Die Empfindlichkeit dieser Methode beträgt 0,5 - 1,0 Gamma/ml. Diese läßt sich mit erhöhter Schichtdicke noch entsprechend steigern.

WALTHER⁷¹ befaßt sich in seiner Arbeit „Nachweis denitrifizierender Bakterien mit naphthionsaurem Natrium“ ausführlich mit dem Problem, in wie weit das GRIESSsche Reagenz durch das neue von BOLTZE und KATZMANN⁴ empfohlene zum chemischen Nachweis denitrifizierender Bakterien ersetzt werden kann und kommt zu folgendem Schluß:

„Zusammenfassend läßt sich über die Leistungsfähigkeit, bzw. die Vor- und Nachteile des Nitritreagenz von GRIESS - ILOSVAY und BOLTZE und KATZMANN zum Nachweis denitrifizierender Bakterien folgendes sagen:

- 1.) Die Vorteile des Reagenz nach GRIESS - ILOSVAY liegen in folgendem begründet:
 - a) Zum Nachweis denitrifizierender Eigenschaften von Testkeimen genügt eine relativ kurze -längstens einstündige Bebrütungszeit der Nitratlösung.

- b) Die Bildung des roten Azofarbstoffes tritt sofort nach Zugabe des Reagenz mit maximaler Intensität auf.
- c) Die Empfindlichkeit der Reaktion ist außerordentlich groß, da noch Natriumnitritmengen in Verdünnungen bis zu 1 : 10 000 000 deutlich nachweisbar sind.

2.) Die Nachteile des GRIESSschen Reagenz:

- a) Zur Herstellung des Reagenz sind voneinander verschiedene Azo- und Diazokomponenten erforderlich.
- b) Die Azokomponente α -Naphthylamin hat cancerogenen Charakter.
- c) Die Lösung des Reagenz ist -in dunklen Flaschen aufbewahrt- nur begrenzt haltbar.

Will man entsprechend dem Vorstehenden die Vorteile bzw. Nachteile der von BOLTZE - KATZMAN⁴ angegebenen Nachweismethode charakterisieren und diese gegenüber der GRIESSschen Methode abwägen, so ergibt sich folgendes Bild:

1.) Die Vorteile sind in folgenden Gegebenheiten zu sehen:

- a) Die Herstellung des Nachweisreagenz ist denkbar einfach, da die Naphthionsäure sowohl als Azo- als auch als Diazokomponente fungiert.
- b) Naphthionsäure besitzt keinen cancerogenen Charakter.
- c) Die Lösung ist praktisch unbegrenzt haltbar.

2.) Die Nachteile:

- a) Die Intensität des Farbstoffes erreicht ihren Höchstwert erst nach einer Stunde.
- b) Die Empfindlichkeit des Nachweisreagenz gegenüber dem GRIESSschen Reagenz ist geringer. Natriumnitrit ist höchstens bis zu einer Versünnung von 1 : 1 000 000 nachweisbar. Daher ist bei der BOLTZE - KATZMANNschen Technik eine längere Bebrütungs-
dauer erforderlich, sofern man eine dem GRIESSschen Reagenz entsprechende Farbin-
tensität erreichen will.

Soweit es der Überblick über die Literatur gestattet, wäre abschließend zu bemerken, daß das Reagenz nach GRIESS das empfindlichste und schnellste Nachweisverfahren und das neue von BOLTZE und KATZMANN das einfachste Mittel zur Bestimmung von Nitrit in biologischem Material darstellt.

II. Methodik

Bei der Entwicklung der Nährlösung für den Schnelltest wurden als Testkeime 24 Stunden alte E. coli-Kulturkeime verwendet; die Aufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bei der Wellenlänge 480 m μ auf einen bestimmten Durchlaßgrad eingestellt, der 200 Millionen Coli/ml entsprach. Von

dieser Suspension wurden drei Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) hergestellt, mit denen die Nährmedien und Zusätze ausgetestet wurden.

Die Substrate wurden stets in gleicher Weise beimpft und bei 40°C im Wasserbad bebrütet. Die Wirksamkeit der in verschiedenen Konzentrationen zugegebenen Substanzen wurde an der Vermehrung der E. coli und an der Menge des gebildeten Nitrites in Abhängigkeit von der Zeit festgestellt. Die Colizahlen wurden mit Hilfe von Keimzahlplatten (Normalendoagar mit Schichtguß nach RAUCH) bestimmt.

Zur quantitativen spektralphotometrischen Beurteilung der Nitritbildung wurde die eingangsbeschriebene Methode von BOLTZE und KATZMANN⁴ verwendet, weil sie die einfachste aller Methoden darstellt und relativ leicht zu standardisieren ist. Für die Bedingungen der Praxis aber, d.h. die Untersuchungen mit dem endgültigen Nährsubstrat, wurde das GRIESSsche Reagenz beibehalten, da es am empfindlichsten ist.

Nitrit - Reagenz nach GRIESS:

Lösung I

α -Naphthylamin	1,0 g
Eisessig	60,0 g
Aqua dest.	140,0 g

Lösung II

Sulfanilsäure	1,6 g
Eisessig	60,0 g
Aqua dest.	140,0 g

(Rotfärbung der Reagenzien ist durch Filtration über Kohle zu beseitigen.)

Zum Gebrauch versetzt man 10 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit mit je ca. 0,5 ml der Lösungen I und II. Rosa- bis Rot- bis Braunfärbung zeigt die steigende Anwesenheit von Nitrit an.

Nitrit - Reagenz nach BOLTZE - KATZMANN:

Natriumnaphthionat 0,1 g

Aqua dest. 100,0 g

Zum Nitritnachweis werden 0,2 ml von der zu prüfenden Lösung mit 1 ml n/100 HCl versetzt und anschließend sofort 3 ml der 0,1%igen Natriumnaphthionatlösung zugefügt.

III. Die Nährlösung des Orientierungstestes

Bei diesen Untersuchungen galt es, nicht nur ein Medium zusammenzusetzen, das den Stoffwechsel der Colikeime aktiviert und ihnen eine schnelle Vermehrung gestattet, die Nährlösung durfte auch nicht zu kompliziert sein, damit die Herstellung leicht und vor allem billig erfolgen kann. Ferner mußte die Lösung so gestaltet werden, daß sie selbst bei Verwendung unter nicht sterilen Arbeitsbedingungen haltbar ist.

a) Das Grundmedium

EYER und v. SCHRADER - BEIELSTEIN¹⁹ wiesen nach, daß Fructose, Glucose und Ribose, sowie der cyclische Alkohol Inosit die wichtigsten Wachstumsbeschleuniger im üblicherweise verwendeten

Fleischwasser darstellen, und daß diese Stoffe praktisch auf sich den gesamten stimulierenden Effekt vereinigen. Um Schwankungen in der Qualität der Nährlösung zu vermeiden, verzichteten wir deshalb auf Fleischwasser, Fleischextrakt usw. und verwendeten:

Lösung A: Dextrose, Fructose und Inosit in Aqua dest.

Lösung B: Asparagin, Acid. succinicum, Kaliumnitrat in Aqua dest.

Medium A wurde eine halbe Stunde im Dampftopf gehalten und dann mit gleichen Teilen der autoklavierten Lösung B gemischt. Die Testlösungen enthielten dann neben den zu prüfenden Zusätzen:

1 Teil A + 1 Teil B + 1 Teil Coliaufschwemmung (s.o.).

Nach der Bebrütung wurde das gebildete Nitrit als Indiz für die Wirksamkeit des Zusatzes mit Natriumnaphthionat quantitativ photometrisch erfaßt.

Die Verwendung von Asparagin in flüssigen Nährböden geht auf CAPALDI und PROSKAUER¹⁵ zurück, die im Jahre 1896 als erste das Wachstum von Coli- und Typhusbazillen in salzhaltigen Nährlösungen prüften, denen als einzige Stickstoffquelle Aminosäuren, bzw. Säureamide, Harnstoff, Purinderivate und anorganischer Stickstoff in Form von N-haltigen Salzen zugesetzt wurde. Die Lebensvorgänge der Bakterien förderte vor allem das Asparagin. NAWIASKY⁴⁹ stellte ebenfalls Versuche mit einigen Aminosäuren mit Bact. proteus

vulgaris an. Von allen geprüften Aminosäuren förderte das Asparagin das Bakterienwachstum am stärksten. BREHMER und MAASSEN₉ verwendeten Asparagin auch in festen synthetischen Nährböden.

b) Wachstumsstimulierende Zusätze

Als günstigster pH-Wert der Nährlösung ergab sich in einem Vorversuch 7,5 (s. auch THIELE und JANSSEN₆₉). Da die Stabilität der Nährlösung bei diesem Wert jedoch nicht mehr gewährleistet war, wurden die weiteren Versuche bei pH 6,6 durchgeführt. Nach SPEYER₆₅ vermehren sich Colikeime zwischen pH 5,4 und 8,4 zahlenmäßig zwar fast gleich stark, es zeigte sich aber in unseren Versuchen, daß die Nitratreduktion in geringem Maße verzögert wurde. Wir mußten jedoch diesen kleinen Nachteil in Kauf nehmen.

Als wachstumsfördernde Stoffe wurden dann folgende Substanzen auf ihre grundsätzliche Wirkung und ihre optimale Konzentration getestet:

1. Magnesiumsulfat
2. Dikaliumhydrogenphosphat
3. Ferrosulfat
4. Pepton aus Fleisch
5. Aminosäuren:

Cystin
Cystein
Methionin

6. Vitamine:

Acid. ascorbinic.
Adermin
Lactoflavin
Vitamin B₁₂
Folsäure
p-Aminobenzoesäure

7. Natriumthioglykolat

8. Boviserin

9. Fermente:

Katalase

zerschallte Hefezellen

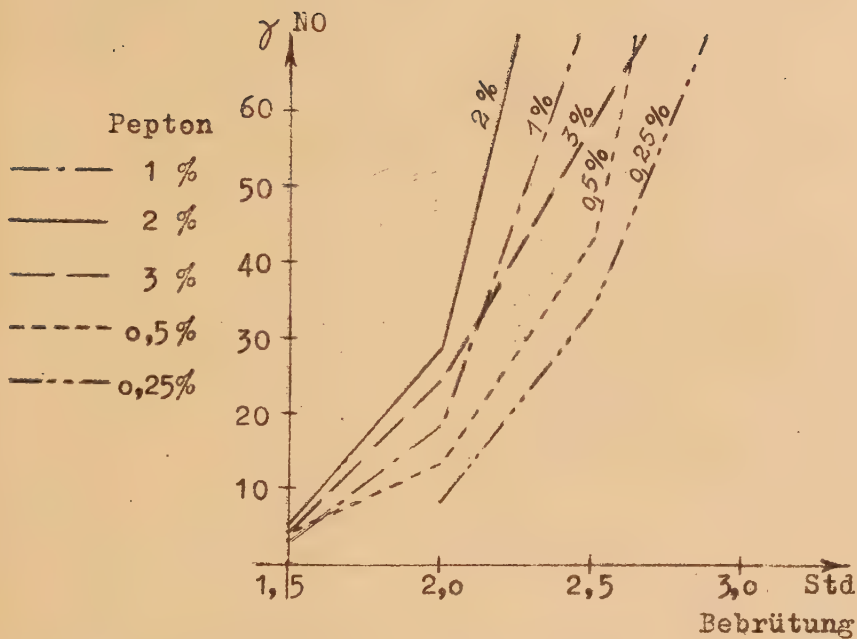
Diphosphopyridinnucleoitid (DPN)

Cytochrom C

Magnesiumsulfat erwies sich in einer Konzentration von 0,1 % als günstig. Zunächst setzten wir auch 0,3 % Calciumchlorid zu, mußten aber später wieder darauf verzichten, da starke Niederschläge auftraten, die einen unregelmäßigen Reaktionsausfall zur Folge hatten.

Ferrosulfat und Dikaliumhydrogenphosphat verbesserten die Nitratreduktion nicht meßbar, beide Stoffe wurden deshalb nicht weiter berücksichtigt. THIELE und JANSSEN⁶⁹ fanden bei ihren Versuchen mit Kationen ebenfalls keine Wachstumsverbesserung für E. coli.

Ein Peptonzusatz verkürzte dagegen die Reaktionszeit erwartungsgemäß erheblich. Die Konzentration wurde mit 2 % optimal befunden. Die folgende graphische Darstellung läßt am Beispiel des Peptons die verschiedenen Wirkungsgrade eindeutig erkennen.



Abzisse: Bebrütungszeit in Stunden bei 40° C

Ordinate: γ-Nitrit in 0,2 ml Coliaufschwemmung

Die zusätzliche Beigabe der Aminosäuren Cystin, Cystein und Methionin allein, sowie in Kombination, ergab in Konzentrationen von 0,025% erst nach mehreren Stunden Bebrütung eine Steigerung der nachweisbaren Nitritmenge. Da aber für unsere Zwecke nur die kürzeren Reaktionszeiten von Bedeutung sind, wurde im Interesse einer einfachen Zusammensetzung auf diese Zusätze verzichtet.

Die Versuche von THIELE und JANSSEN⁶⁹ hatten 1941 ergeben, daß Vitamin A, B, D, und E keine Verstärkung des Wachstums von *E. coli* brach-

ten, daß bei Vitamin C - Zusatz eine Begünstigung nachweisbar war. Wir stellten fest, daß die Nitrataseaktivität auch durch Adermin verbessert wurde, denn eine Kombination von Adermin, Vitamin C und p-Aminobenzoesäure erwies sich als nützlich.

Durch Erniedrigung des Redoxpotentials mit Hilfe von Natriumthioglykolat (0,05%) ließ sich die Nitritbildung als reduktive Stoffwechselleistung dagegen in keiner Weise beeinflussen.

Boviserin in einer Konzentration von 10% beschleunigte die Nitritbildung, flockte aber in der Stammlösung zu stark aus und wurde deshalb nicht beibehalten.

Von den Fermenten brachte Katalase (Boehringer, Mannheim) in einer Konzentration von 0,66 µg/ml eine geringe Steigerung der Nitritausbeute, aber keine schnellere Bildung. Cytochrom C (Boehringer, Mannheim) zeigte keinerlei Effekt, wohl aber konnte durch Diphosphopyridinnucleotid (Boehringer, Mannheim) eine Beschleunigung der Nitritbildung erreicht werden. Wir entschlossen uns aber, auch auf diesen Zusatz zu verzichten, weil die Steigerung im Verhältnis zu der ungenügenden Haltbarkeit zu gering war (Lagerung im Exsiccator und Kühlschrank vorgeschrieben). Auch der Zusatz von zerschallten Hefezellen wurde nicht eingeführt; die Wirkung war zu gering und die Standardisierung zu schwierig.

Abschließend wurde ein Versuch durchge-

geführt, bei dem nochmals alle geprüften Zusätze zusammen verwendet wurden, um eventuell auftretende Kombinationseffekte nicht zu übersehen, doch zeigte sich dabei eindeutig eine Verschlechterung der Wirksamkeit.

Es verblieben also nach diesen Versuchen als wachstumsstimulierende Zusätze:

Adermin, Vitamin C, p-Aminobenzoesäure und Pepton, ferner wurde Magnesiumsulfat zugefügt.

c) Verbesserung der Haltbarkeit und der Selektivität

Geringer Wassergehalt und hoher osmotischer Druck sind die Grundlagen der Konservierungstechnik. Sollte unsere Nährlösung haltbar sein, dann mußte dies berücksichtigt werden, doch konnte eine einfache Abmessung der Lösung mittels Pipette nur erfolgen, wenn das Substrat noch ausreichend dünnflüssig blieb. Dies war der Fall bei der Verwendung von 22 g Pepton auf 100 ml Wasser, sowie den übrigen Substanzen im entsprechenden Verhältnis. Wir mußten aber nach den Ergebnissen von RAATZ₅₅ immer noch mit einer langsamen Vermehrung eventuell hineingebrachter Keime rechnen. Tatsächlich trat auch bei Kontrolluntersuchungen störende Nitritbildung durch Sporenbildner auf, wenn wir ein derartiges Reagenz in einer offenen Flasche einige Tage lang stehen ließen. Dieser Mangel wurde durch einen Hexachlorophenzusatz in alkoholischer Lösung beseitigt. Eine Abtötung der mit den Staubteilchen hineingefallenen Sporenbildner ist

damit zwar nicht zu erreichen, die selektive Hemmwirkung des Hexachlorophens auf grampositive Keime verhinderte jedoch sowohl in der konzentrierten Nährlösung als auch beim praktischen Gebrauch eine störende Nitritbildung. Kontrollversuche sicherten diesen Befund:

- 1.) Aus einer Serie von aeroben Sporenbildnern wurden zwei sehr stark nitratreduzierende Stämme herausgesucht und in abgestuften Mengen den sterilen Leitungswasserproben beigegeben. 2 mg % Hexachlorophen verhinderten bis zu einer Keimzahl von 100 000 Sporenbildnern pro ml eine nachweisbare Nitritbildung. Eine Hemmung noch größerer grampositiver Bakterienzahlen ist nicht erforderlich, weil ein Wasser mit derartig hohen Keimwerten ohnehin zu beanstanden ist.
- 2.) Fertiges Reagenz wurde mit starken Nitritbildnern massiv beimpft und nach 2, 8 und 14 Tagen mit sterilem Wasser verdünnt bebrütet. Es trat nach einer Bebrütung von 8 Stunden bei 40°C keine positive Nitritreaktion auf.

d.) Die Herstellung der gebrauchsfertigen Nährlösung
 (= „Colireagenz I W(asser)“)

Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut)	MERK.	22,0
Tween 80 GOLDSCHMIDT	ggt	XXII
Magnesiumsulfat + 7 H ₂ O		1,1
Kaliumnitrat		11,0
Acid. succinicum		1,1
Asparagin		2,2
Aquadest. ad		100,0

Diese Substanzen werden gleichzeitig in dem Wasser gelöst und 30 Minuten bei 120°C autoklaviert. Dann fügt man hinzu:

Acid. ascorbinicum MERK	0,11
Adermin MERK	0,11
p-Aminobenzoesäure MERK	0,11
Dextrose	2,20
Fructose	1,10
Inosit	3,30

Mit diesen Bestandteilen beläßt man die Lösung nochmals 30 Minuten im Dampftopf. Nach dem Abkühlen erfolgt die Zugabe von 1,0 g (= 1,3 ml bei 15°C) Hexachlorophen in absolutem Alkohol (Vorratslösung: 2,2 g Hexachlorophen auf 100,0 g Alkohol.abs.) und anschließend wird die Lösung mit konzentrierter Natronlauge auf pH 6,6 eingestellt. Man hebt die Lösung zweckmäßig in einer sterilisierten, braunen Flasche auf, die vor Gebrauch zu schütteln ist. Die Entnahme aus der Vorratsflasche soll mit sauberen Pipetten erfolgen; empfehlenswert ist eine Gummihutpipette mit Eichmarke in dem Flaschenschraubverschluß.

e.) Die Durchführung des Testes

Die Konzentration des Colireagens I W ist so ausgelegt worden, daß 1,0 ml mit 10 ml des zu untersuchenden Wassers versetzt und im Wasserbad bei 40°C bebrütet werden. Die Reaktionsgefäße (Reagenzgläser mit Glas- oder Metallkappen bzw. Korkstopfen) sollen sauber und steril sein; fehlt

ein geeigneter Sterilisator, dann sind sie vor dem Gebrauch 10 Minuten lang in Leitungswasser ohne Zusätze auszukochen.

Bei Fehlen eines Wasserbades kann man das Solotherm-Gerät nach KNORR und BORNEFF³⁸ verwenden. Die Bebrütung im Brutschrank ist wegen der Verzögerung des Temperatúrausgleiches nicht brauchbar. Grundsätzlich ist zu empfehlen, 3 Proben parallel anzusetzen und die Reaktion nach 5, 7 und 8 Stunden abzulesen. Hierzu versetzt man nach diesen Zeiten die Wasserproben mit Nitritreagenz nach GRIESS oder man verwendet die Modifikation nach KNORR und BORNEFF³⁸ in fester Form („Colireagenz II“ = homogenisiertes Gemisch von Zitronensäure + α -Naphthylamin + Sulfanilsäure; zum Gebrauch gibt man davon ca. 0,5g auf 10 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit).

Unerläßlich ist eine Kontrolle auf bereits im Wasser vorhandenes Nitrit.

Man setzt deshalb zu Beginn der Untersuchung ein 4. Röhrchen der Wasserprobe mit Colireagenz I^W an und gibt Colireagenz II bzw. das GRIESSsche Reagenz sofort ohne Bebrütung hinzu. Tritt eine Verfärbung auf, dann ist zu prüfen, ob diese durch einen Nitritgehalt des Wassers oder des Colireagenz I bedingt ist.

Praktisch geht man so vor, daß im Falle einer sofortigen positiven Reaktion diese nochmals mit Aqua dest. anstelle des zu prüfenden Wassers durchgeführt wird. Tritt wiederum Rotfärbung auf, dann

ist das Reagenz I unbrauchbar. Tritt dagegen keine Rotfärbung bei der Kontrolle mit Aqua dest. auf, so enthält das zu untersuchende Trinkwasser von hause aus Nitrit. Ein Versagen des Colireagenz IW. bemerkten wir bisher jedoch nur bei einer Versuchsreihe mit hexachlorophenfreiem Reagenz.

Bei einer starken Rotfärbung des Trinkwassers erübrigt sich die Colireaktion, da ein solches Wasser ohnehin zu beanstanden ist. Bei ganz schwachen Rosafärbungen kann man die Colireaktion unter Vorbehalt als positiv bezeichnen, wenn nach der Bebrütung die Färbung im Vergleich zu einer dann nochmals frisch angesetzten Wasserprobe eindeutig stärker ausfällt.

IV. Der Colitest unter den Verhältnissen der Praxis

Wir überprüften das Verfahren mit Wasserproben, die aus Dorfbrunnen in der Umgebung von Erlangen entnommen wurden. Die Untersuchung erstreckte sich sowohl auf den Nitritreduktionstest als auch auf die Bestimmung der Gesamtköimzahlen von E. coli und den Coliformen. 54 Brunnenwasseruntersuchungen wurden ohne Hexachlorophenzusatz zum Colireagenz I W durchgeführt. Wir verglichen dabei die Endocolizahl mit dem zeitlichen Auftreten des Nitrites.

Tabelle 3

E.coli/ml	Nitritreaktion					Mittl. Bebrütungs= zeit
0	6 Proben n. 8 Std. negativ					8 Std
1 - 10	3	"	"	8	" positiv	7,5 "
	1	"	"	7	" "	
	1	"	"	6	" "	
11 - 100	1	"	"	8	" "	6 "
	1	"	"	7	" "	
	8	"	"	6	" "	
> 100	3	"	"	5	" "	5 "

Die Empfindlichkeit stimmt mit der von BORNEFF₅ gefundenen befriedigend überein, d.h. es sind einzelne Colikeime pro ml Wasser an der positiven Nitritreaktion nach 7-8 Stunden Bebrütung erkennbar. Grundsätzlich kann man aber im Einzelfall nicht entscheiden, ob die positive Reaktion durch wenige voll fermenttüchtige E. coli oder durch zahlreiche, schon etwas geschädigte coliforme Keime erzeugt wurde.

Das hexachlorophenfreie Colireagenz I W ergab mit 24 weiteren Brunnenproben, die neben den Colikeimen vor allem aerobe Sporenbildner enthielten, in 18 Fällen fehlerhaft positive bzw. zu frühzeitig positive Nitritreaktionen. Dieser Befund weist eindeutig darauf hin, daß die selektive Hemmung grampositiver Keime unerlässlich ist.

Da die Hauptaufgabe der Untersuchungen

die Erfassung von Colikeimen aus relativ frischen fäkalen Verunreinigungen ist, führten wir mehrere Versuchsreihen mit Leitungswasser durch, das wir experimentell mit 24 Std. alten Fäkalien infizierten. Methodik: 0,3g Fäces wurden jeweils in einem sterilen Multimix mit 500ml Wasser homogenisiert und stufenweise bis 1:100 000 verdünnt. Jede Konzentration behandelten wir eine Minute mit einem Ultraturraxgerät (20 000 U/Min). Von den einzelnen Verdünnungen wurden für die verschiedenen Bebrütungszeiten je 8 Röhrchen mit 10ml Wasser und 1ml des nunmehr hexachlorophenhaltigen Colireagens IW angesetzt. Die Colizahl wurde auf Normalendoagar ermittelt. Das Ergebnis einer dieser Kontrolluntersuchungen verdeutlicht die Empfindlichkeit der Methode:

Tabelle 4

Nitrit= reaktion nach	Colizahl pro ml Wasser					
	>10 000	10 000	6 500	30	2	<1
4 Std. 40°	++++	++	+	-	-	-
5 "	++++	+++	++	-	-	-
6 "	++++	++++	+++	++	-	-
7 "	++++	++++	++++	+++	++	-
8 "	++++	++++	++++	++++	+++	+

+ = gerade noch deutlich wahrnehmbare Rötung
 ++ = eindeutige Rötung
 +++ = starke Rötung
 ++++ = Braunfärbung

Massive Verunreinigungen sind also bereits nach

3,5 - 4 Stunden Bebrütung nachweisbar. 30-40 Coli=

keime pro ml Wasser benötigen eine Bebrütungszeit von 6 Stunden, während einzelne Keime in 10 ml Wasser nach 7-8 Stunden erfaßbar sind. Fällt die Nitritprobe nach 8 Stunden negativ aus, ist die Wasserprobe mit hinreichender Sicherheit als „nicht verdächtig auf frische Verunreinigungen mit Fäkalien“ zu bezeichnen. Eine Bebrütung über 8 Stunden hinaus ist nicht erforderlich, auch dürfte für die praktischen Belange eines Orientierungstestes der Ansatz von 10 ml Wasser genügen. Die Bebrütung von 100 ml Wasser mit 10 ml Colireagenz IW ist jedoch jederzeit durchführbar.

Die genannten Empfindlichkeiten stellen aber nur Richtwerte dar. Da es sich um ein Titerverfahren handelt, ist die Angabe einer genauen Colizahl pro ml nicht möglich. Die Schwankungsbreite der mittleren Empfindlichkeit bezogen auf die Endocolizahl ist deshalb ziemlich groß, wir bestimmten sie bereits früher mit rund 100%. Das Titerverfahren bietet aber den großen Vorteil, daß die Verteilung der Colikeime in der zu untersuchenden Wassermenge keine Rolle spielt.

V. Ergebnisse der Untersuchungen

THIELE und DECKART⁶⁸ kamen 1946 zu dem Schluß, daß sich Nitritbildner im Wasser infolge der geringen Keimzahl erst nach 1-2. tägiger Bebrütung nachweisen lassen. Sie stellten fernerheraus, daß es nicht angängig ist, *Bacterium coli* in

sog. Schnellmethoden durch Herausgreifen einzelner Reaktionen nachweisen zu wollen, besonders weil die Nitritbildung nicht spezifisch für E. coli ist. Wenn wir uns trotzdem für die nochmalige Bearbeitung dieser Frage entschlossen haben, dann aus der Überlegung, daß es zur Zeit außer Nitrit kein Stoffwechselprodukt der Coliformen gibt, das mit derartig einfachen Methoden in solch geringen Spuren nachgewiesen werden kann. Voraussetzung war jedoch eine entsprechende Verkürzung der Bebrütungszeiten.

Unsere Versuche führten zu dem Ergebnis, daß eine negative Nitritreaktion nach 8-stündiger Bebrütung von 10 ml Wasser bei 40°C unter Zusatz einer optimalen Nährlösung hinreichend die einwandfreie Beschaffenheit des Trinkwassers sichert und damit einen direkten Schutz der Gesundheit des Verbrauchers im zur Zeit möglichen Ausmaß gewährleistet.

Eine positive Nitritreaktion ist grundsätzlich bedenklich.

Sie kann verursacht sein:

- 1.) durch Nitrit im Wasser
- 2.) durch unsaubere Geräte
- 3.) durch die Anwesenheit von nitritreduzierenden Keimen
 - a) gramnegative Bakterien insbesondere der TPE- und der Coligruppe
 - b) einzelne grampositive Arten, bes. der aeroben Sporenbildner.

Der Nitritgehalt des Wassers ist durch eine Kontrollreaktion auszuschließen, die Wirksamkeit grampositiver Keime wird durch einen gramelektiven Zusatz verhindert. Von den gramnegativen Bakterien im Wasser stellen die Fluorezenten eine wichtige Gruppe dar. Wir haben aber schon bei den früheren Versuchen -BORNEFF₅- feststellen können, daß praktisch nur ein sehr geringer Teil dieser Keimarten bei 40°C wächst, für die wahrscheinlich die Diagnose *Pseudomonas aeruginosa* zutreffend sein dürfte, und daß selbst bei der Bebrütung bei 22°C nur etwa die Hälfte der aus Wasserproben isolierten Fluoreszenten nachweisbare Nitritmengen erzeugte.

Die Reduktion des Nitrates des Colireagenz I W in einer Wasserprobe läßt deshalb mit groBer Wahrscheinlichkeit auf Stoffwechselleistungen von Keimen der Salmonella- oder der Coligruppe schließen. Dadurch wird eines der wesentlichen Argumente - die ungenügende Spezifität der Reaktion - gegen die Verwendung der Nitratreduktion zwar nicht vollständig, für die praktischen Belange aber doch ausreichend, entkräftet. Wir müssen hervorheben, daß es keinen Widerspruch darstellt, wenn wir mit THIELE und DECKART₆₈ übereinstimmen, daß für den normalen Colinachweis im Wasser die Nitritreduktion nur den Wert einer zusätzlichen Untersuchung besitzt. Der Nitratreduktions-Schnelltest darf eben nicht als Ersatz sondern lediglich als Ergänzung der üblichen Untersuchungsverfahren angesehen werden!

Bei mehrfachem Ansatz der gleichen Probe können massive Fäkalverunreinigungen nach 4 Stunden erkannt werden. Damit ist der zweite Einwand von THIELE und DECKART⁶⁸ gegen die Nitratreduktion -die zu langsame Reaktion bei geringen Keimzahlen- gleichfalls weitgehend entkräftet. Zudem fügt sich die maximale Bebrütung von 8 Stunden gut in den Rahmen der normalen Arbeitszeiten ein, sodaß Schwierigkeiten wie z.B. bei den Galle-Violettrotstreifen vermieden werden. Die praktische Durchführung der Reaktion wurde so vereinfacht, daß sie auch in der Hand von angelernten Laien sicher arbeitet.

Unter diesen Verhältnissen ist lediglich zu beachten:

- 1.) Die Reaktionsgefäße und ihre Verschlüsse müssen sauber und steril (ausgekocht) sein. Trocken sterilisierte Gefäße können bei staubgeschützter Lagerung unbegrenzt auf Vorrat genommen werden.
- 2.) Die Bebrütung muß bei 40°C in einem automatisch geregelten Wasserbad oder im Solotherm-Gerät nach Gebrauchsanweisung erfolgen.
- 3.) Die Abmessungen der Flüssigkeiten müssen genau vorgenommen werden. Reaktionsröhrchen sind bis zum Eichstrich 10 ml aufzufüllen. Das Colireagenz I W ist nur mit geeichter Gummihutpipette (Eichstrich = 1 ml) aus einer entsprechenden Vorratsflasche zu entnehmen. (Normale Pipetten müssen gleichfalls steril sein!).
- 4.) Die Wasserprobe ist 4-fach anzusetzen. Röhrchen 1 wird sofort mit Colireagenz II beschickt -es darf keine Rotfärbung auftreten. Röhrchen 2 wird nach 4 oder 5 Stunden, die beiden anderen nach 7 bzw. 8 Stunden Bebrütung bei 40°C

mit dem Colireagenz II versetzt. Eine Rosa- bis Rotfärbung zeigt eine Verunreinigung mit coliformen Keimen an. Je früher positiv, desto stärker ist die Infektion des Wassers.

Die reinen Materialkosten des Colireagenz I W betragen pro Reaktion (4-facher Ansatz) ca. 0,15 DM, die zugehörige Colireagenz II-Menge 0,05 DM.

Zusammenfassung

Im Zuge der Trinkwasser- und Lebensmittelüberwachung hat der Nachweis von *Bact. coli* im Laufe der letzten Jahre eine steigende Bedeutung erfahren. Der Nachteil der Laboratoriumsuntersuchungen besteht in der Hauptsache in dem erheblichen Zeitaufwand von 2-3 Tagen, der für den gesicherten Nachweis von Fäkalcolibakterien erforderlich ist. Damit ist aber der direkte Schutz der Gesundheit der Bevölkerung nicht mehr gewährleistet, weil die Lebensmittel bis zum Eintreffen des Befundes aus dem Laboratorium in der Regel bereits verkauft und verzehrt wurden, und auch das Trinkwasser längst den Weg zum Verbraucher gefunden hat. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Orientierungstestverfahren einzuführen, die innerhalb von kürzester Zeit ein Ergebnis vermitteln.

Die Aufgabe dieser Dissertationsarbeit lautete, einen solchen Schnelltest auf *E. coli* für die speziellen Verhältnisse der Wasserversorgung zu verbessern. Die bisherigen Ergebnisse der Arbeiten aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Erlangen besagten, daß man ca. 30 *E. coli* pro Gramm Milch und Speiseeis nach 6 Stunden mit Hilfe der Nitratreduktion nachweisen kann. Für die Wasseruntersuchung bedurfte es jedoch spezieller Methoden, da dieses Substrat nicht wie die Milch, selbst ein vorzügliches Nähr-

medium darstellt. Es wurde deshalb zunächst eine geeignete chemische Nachweismethode für Nitrit aus-
gesucht und das Verfahren photometrisch standarti-
siert. Die weiteren Versuche galten dann der Zu-
sammensetzung einer hochkonzentrierten Nährlösung.

Einem Grundmedium wurden wachstumssti-
mulierende Substanzen (Pepton, verschiedene Zucker,
Salze) zugefügt und deren Wirksamkeit in verschie-
denen Konzentrationen an der Vermehrung der E. coli
und an der Menge des gebildeten Nitrites in Abhän-
gigkeit von der Zeit festgestellt. Als brauchbar er-
wiesen sich zur Stoffwechselaktivierung Asparagin,
Vitamin B₁ und C. und p-Aminobenzoesäure. Weitere
schwach aktivierende Substanzen wurden nicht ver-
wendet, um die Nährlösung einfach zu gestalten und
so eine leichte und billige Herstellung zu garan-
tieren. Ferner mußte die Lösung derart beschaffen
sein, daß sie selbst bei Verwendung unter nicht ste-
rilen Arbeitsbedingungen haltbar bleibt. Das Sub-
strat wurde so stark konzentriert, daß es noch aus-
reichend dünnflüssig blieb, um eine einfache Ab-
messung mittels Pipette zu ermöglichen. Durch Hexa-
chlorophenzusatz erreichten wir schließlich eine
Konservierung der Stammlösung und gleichzeitig ei-
ne selektive Hemmung grampositiver Begleitkeime
bei der Colitestung selbst. Es gelang also stören-
de, fehlerhafte positive Nitritbildungen auszu-
schalten. Daß auf eine solche Hemmung der grampo-
sitiven Keime, bei denen es sich vorwiegend um

aerobe Sporenbildner handelt, nicht verzichtet werden kann, hatte eine Serienuntersuchung von Brunnenwässern mit einer Reagenzcharge ohne Hexachlorophen gezeigt.

Die Durchführung des Testes wurde im Vergleich zu dem von BORNEFF₅ angegebenen milchhaltigen Reagenz stark vereinfacht: 1,0 ml Reagenz werden mit 10 ml des zu untersuchenden Wassers versetzt und bei 40°C bebrütet. Zur Able- sung der 4 parallel angesetzten Proben nach O(- Nitritkontrolle) 5, 7 und 8 Stunden wird Nitrit- reagenz nach GRIESS zugesetzt. Eine Rosa- Rot- bis Braunfärbung zeigt die steigende Anwesenheit von coliformen Keimen an. An Hand von Versuchen mit E. coli-infizierten Wasserproben konnten wir nachweisen, daß massive Verunreinigungen bereits nach 3,5 - 4 Stunden nachweisbar sind, 30-40 Coli pro ml nach 6 Stunden und einzelne Colikeime nach 7-8 Stunden.

Die Vorteile dieses Nitratreduktions- testes auf coliforme Keime sind:

- 1.) Bei der Verwendung des Coli I-Reagenz W be- nötigt man außer sterilen Reaktionsröhrchen keine besonderen keimfreien Geräte. Angebro- chene Vorratsflaschen brauchen nicht nachste- rilisiert zu werden. .
- 2.) Der Test ist ausreichend empfindlich und be- sitzt eine zufriedenstellende Selektivität.

- 3.) Durch die einfache Handhabung arbeitet der Test auch in der Hand von angelernten Laien zuverlässig und erfordert keine besondere Laboreinrichtung.
- 4.) Die Materialkosten für diesen Test sind sehr gering.
- 5.) Die Reaktionszeiten des Verfahrens fügen sich gut in den Rahmen der üblichen Arbeitszeiten ein.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s
=====

1. ABBA, F.: Baumgartens Jahresbe-
richt 11 (1895):309
2. ARNOLD: Münch.med.Wschr. 1943:288
3. BERGEY: Manual of determinative
Bacteriology, Baltimore 1948
4. BOLTZE, K.H. u. KATZMANN, H.: Pharm.Z.halle 94 (1955)
:175
5. BORNEFF, J.: Arch.Hyg. 141 (1957):505
6. BORNEFF, J.: " " 137 (1953):505
7. BORNEFF, J. u. B.FROBEL: " " 141 (1957):141
8. BRAUNE, J.F.: " " 140 (1956): 28
9. BREHMER u. MAASSEN: Zbl.Bakt. I.O. 169 (1957):516
10. BRISOU, J. u. E.MAGROU: Ann.Inst.Pasteur
73 (1947):290
11. BRUNS, H.: Gas-u.Wasserfach 89
(1948):55
12. BURKHARDT u. LEGLER: Arch.Hyg. 140 (1956):140
13. BURRI, R.: Hyg. Rundschau 5 (1895):49
14. BUTTIAUX, R.: Collection de l' Institut
Pasteur, Edition médica-
les Flammarion, Paris 1951
15. CAPALDI u. PROSKAUER: Zschr.Hyg. 23 (1896):452
16. COSTAS, G.M. u. G.T.COSTAS: Le Lait 31 (1951):7
17. DUNBAR, W.: Zschr. Hyg. 12 (1892):498
18. EBERT: Diss. Erlangen 1952
19. EYER, H. u. Mitarb.: Zbl.Bakt. I.O. 166
(1956):266
20. FÖRG, F.: Mitt.Geb.Lebensm.unters.
Eidg.Gesdh.amt Bern 4
(1953):137

21. FREUDENREICH, E.: Zbl. Bakt. I. O. 18 (1895): 102
22. GÄRTNER, A.: Zschr. Hyg. 67 (1910): 55
23. GARGANI, G. und
G. MARRACCINI: Nuovi Annali d' Igiene e
Microbiologia 5 (1954): 209
24. GERMUTH, F. G.: Ind. Eng. Chem. Anal.
Edit. 1 (1929): 28
25. GERNER, G.: Dtsch. Arch. klin. Med. 204
(1957): 25
26. GERNER u. HENNING: Dtsch. med. Wschr. 1956: 1669
27. GILCREASE, F. W. und
S. M. KELLY: J. AMER. Water Works
Ass. 47 (1955): 683
28. GRIESS, J. P.: Ber. dtsh. chem. Ges.
11 (1878): 624
29. GUTHOF und DAMMAN: Arch. Hyg. 142 (1958): 559
30. HABS und LANGELOH: " " 142 (1958): 401
31. ILOSVAY, L.: nach BOLTZE u. KATZMANN
Pharm. Z. halle 94 (1955): 175
32. JENDRASSIK, L. und Mitarb.: ebda
33. JORDAN und BURROW: Jordan-Burrows Textbook
of Bact., Philadelphia
und London 1949
34. KAUFFMANN, F.: Enterobacteriaceae 1954
35. KIESSLING, F.: Hyg. Rundschau 3 (1893): 724
36. KLEIN, P.: Berlin. Münch. tierärztl.
Wschr. 68 (1955): 214
37. KNORR, M.: Münch. med. Wschr. 1927: 1949
38. KNORR, M. und
J. BORNEFF: Milchwissensch. 12
(1957): 58
39. KRAUS, H.: Zbl. Bakt. I. O. 168 (1957): 21
40. KRUSE, W.: Zschr. Hyg. 17 (1894): 1
41. LEGLER und GERNER: Münch. med. Wschr. 35
(1957): 1255

42. LEVIN u. Mitarb.: J.Amer.Water Works
Ass.49 (1957):1069
43. LEVINE, M.: nach Minkewitsch, Zschr.
Hyg. 109 (1929):350
44. LUNGE, Z.: nach Boltze u. Katzmann
Pharm.Z.halle 94 (1955):175
45. MACE: Annales d'Hygiene Publique
19 (1888):501
46. MARPMANN: Zbl.Bakt.I.O.50 (1909):267
47. MINKEWITSCH, J.E.: Zschr.Hyg.111(1930):180
48. MAASSEN, W.u.W.PRIESS: " " 130(1949):340
49. NAWIASKY: Arch.Hyg.66 (1908):209
50. PARR, L.W.: Zbl.ges.Hyg.36(1936):618
51. PELZ: Zbl.Bakt.I.O.57(1910):5
52. PFEILSTÜCKER, I.: Zschr.Kinderheilk. 1949
:596
53. POIJOL, G.: nach Baumgartens Jahres=
ber.13 (1897):411
54. QUANTZ, E.: Zschr.Hyg. 78(1914):193
55. RAATZ, H.: Diss.Erlangen 1955
56. RAUCH, G.: Arch.Hyg.128 (1942):63
57. ROMIJN, G.: nach Boltze u Katzmann
Pharm.Z.halle 94(1955):175
58. SAHLQUIST, B. und
Mitarb.: Svenska mejeritidningen
45(1953):89 u.101 nach
Milchwissensch.1953:397
59. SCHÄFER, W.: Zbl.Bakt.I.O.160(1954):54
60. SCHARDINGER, F.: " " I.O.16(1894):853
61. SCHILLING: GWF 1956:629
62. SCHÖNBERG, F.: Lebensmitteltierarzt
4 (1953):137
63. SELENKA, F.: Arch.Hyg.142 (1958):241

64. SMITH, Th.: Zbl. Bakt. I.O. 18 (1894):853
65. SPEYER, E.: " " I.O. 22 (1924):340
66. STANDARD METHODS FOR
THE EXAMINATION WATER
AND SEWAGE: München 1951
67. STIEGLITZ, I.J. und
A.E. PALMER: Z. Pharmacol. 51 (1934):398
nach Boltze u. Katzmann,
Pharm. Z. halle 94 (1955):175
68. THIELE, H. u. H. DECKART: Zschr. Hyg. 129 (1949):75
69. THIELE, H. u. JANSSEN: Arch. Hyg. 126 (1941):121
70. TOPLEY und WILSON: Principles of Bacteriology
and Immunity, London 1946
71. WALTHER, H. J.: Zbl. Bakt. I.O. 167 (1957):238
72. WUNDT, W.: Dtsch. med. Wschr. 75
(1950):1471
73. ZIEGLER: Med. Klinik 1941
nach Thiele u. Deckart
Zschr. Hyg. 129 (1949):75

Es möge gestattet sein, den Herren
Professoren Dr. J. Schwemmle und
Dr. M. Knorr sowie dem Herrn
Privatdozenten Dr. J. Borneff an
dieser Stelle für die freundliche
Übertragung und Förderung der
vorliegenden Arbeit und für die
vielen wertvollen Hinweise
meinen besten Dank auszusprechen.

Lebenslauf

Am 26. September 1931 wurde ich als Tochter des technischen Bundesbahninspektors Fritz Kabsch und seiner Ehefrau Edith, geb. Hel-
le in Breslau geboren. Von 1939 - 1943 besuch-
te ich die Volksschule und anschließend ver-
schiedene Oberschulen, bis ich am 7. März 1951
auf dem Einbecker Gymnasium die Reifeprüfung
ablegte. Nach beendigter Lehrzeit als Apothe-
kerpraktikantin in Wuppertal bestand ich am
13. März 1953 in Düsseldorf das pharmazeuti-
sche Vorexamen und studierte drei Semester bis
1954 an der Münchner Universität Pharmazie. Im
August 1956 bestand ich in Erlangen die phar-
mazeutische Staatsprüfung und begann im Okto-
ber desselben Jahres meine Tätigkeit bei Herrn
Privatdozent Dr. Borneff im Hygienischen In-
stitut der Universität Erlangen als Doktorandin.

